

AN

7/3,AB,LA/1

Antimicrobial peptides from penaeid shrimps - active against bacteria and fungi

Patent Assignee: CENT NAT RECH SCI (CNRS); IFREMER INST FR RECH EXPL MER (IFRE-N); CNRS CENT NAT RECH SCI (CNRS)

Inventor: BACHERE E; BULET P; DESTOUMIEUX D

Number of Countries: 020 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
FR 2766191	A1	19990122	FR 979214	A	19970721	199912 B
WO 9905270	A2	19990204	WO 98FR1583	A	19980720	199912
EP 1000153	A2	20000517	EP 98939715	A	19980720	200028
			WO 98FR1583	A	19980720	

Priority Applications (No Type Date): FR 979214 A 19970721

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

FR 2766191	A1	29		C07K-014/435	
------------	----	----	--	--------------	--

EP 1000153	A2 F			C12N-015/12	Based on patent WO 9905270
------------	------	--	--	-------------	----------------------------

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

WO 9905270	A2 F			C12N-015/12	
------------	------	--	--	-------------	--

Designated States (National): US

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

Abstract (Basic): FR 2766191 A

The following are claimed:

(1) an antimicrobial peptide that is obtainable from penaeid shrimps, has a molecular weight of 5-7 kD, has an isoelectric point of at least 9, has a N-terminal portion comprising a proline-rich region of 15-25 amino acids, and has a C-terminal portion comprising a region of 20-30 amino acids containing six cysteines forming three intramolecular disulphide bridges;

(2) a peptide comprising at least 5 amino acids of the peptide of (1);

(3) a nucleic acid comprising at least 10 bp, preferably at least 20 bp, of a sequence coding for the peptide of (1) or (2);

(4) an expression cassette comprising at least one nucleic acid sequence as in (3) under the control of a promoter;

(5) a recombinant vector containing at least one nucleic acid as in (3);

(6) a prokaryotic or eukaryotic cell transformed with the expression cassette of (4).

USE - Peptides as above, called penaeidins, have antibacterial and antifungal activity, e.g. against *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Neurospora crassa* and *Fusarium oxysporum*, and can be used in human and veterinary medicine, agriculture and aquaculture.

Dwg.0/5

Language, Pages: FR 2766191 (29); EP 1000153 (F); WO 9905270 (F)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/435, A61K 38/17	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/05270 (43) Date de publication internationale: 4 février 1999 (04.02.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01583</p> <p>(22) Date de dépôt international: 20 juillet 1998 (20.07.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/09214 21 juillet 1997 (21.07.97) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER) [FR/FR]; 155, rue Jean-Jacques Rousseau, F-92138 Issy-les-Moulineaux (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DESTOUMIEUX, Delphine [FR/FR]; 1, rue de l'Hermitage, F-34070 Montpellier (FR). BACHERE, Evelyne [FR/FR]; 1, plan Goutier, F-34830 Clapiers (FR). BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR).</p> <p>(74) Mandataires: ORES, Béatrice etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: CRUSTACEAN ANTIMICROBIAL PEPTIDES</p> <p>(54) Titre: PEPTIDES ANTI-MICROBIENS DE CRUSTACES</p>		
<p>YRGGYTGPIRPPPIGRPPLR-----LVVC--ACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK</p> <p>YRGGYTGPIRPPPIGRPPFR-----PVC-NACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK*</p> <p>pEVYKGGYTRPIRPPPFVRPLPGGPiGPYNGCPVSCRGISFSQARSCCSRLGRCHVKGYS*</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns antimicrobial peptides obtained from penaeid prawns having the following characteristics: the molecular mass of about 5 to 7 kDa; the pHi not less than 9; the N-terminal portion comprises a region (A) of about 15 to 25 amino acids rich in proline; and the C-terminal portion comprises a region (B) of about 20 to 30 amino acids, containing 6 cysteine residues forming three intramolecular disulphide bonds. The invention also concerns the nucleic acid sequences coding for said peptides, and enabling their production by genetic engineering.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Peptides anti-microbiens, obtenus à partir de crevettes pénéides, et dont: la masse moléculaire est d'environ 5 à 7 kDa, la pHi est supérieur ou égal à 9, la portion N-terminale comprend une région (A) d'environ 15 à 25 acides aminés, riche en proline, et la portion C-terminale comprend une région (B) d'environ 20 à 30 acides aminés, qui contient 6 résidus cystéine formant trois ponts disulfure intramoléculaires. Séquences d'acide nucléique codant pour lesdits peptides, et permettant leur production par génie génétique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PEPTIDES ANTI-MICROBIENS DE CRUSTACES.

L'Invention est relative à de nouveaux peptides anti-microbiens produits par des crevettes pénéides.

Des peptides dotés de propriétés anti-microbiennes sont produits par
5 une grande variété d'espèces (animales ou végétales), chez lesquelles ils participent à des mécanismes non-spécifiques de défense contre les infections. Ces peptides font l'objet d'un intérêt croissant, en particulier du fait qu'ils possèdent généralement un large spectre d'action, et une faible cytotoxicité pour les cellules eucaryotes.

Les comparaisons des séquences en acides aminés, des structures
10 secondaires, et les similitudes fonctionnelle ont permis de définir quatre groupes principaux, auxquels on peut rattacher la plupart des peptides anti-microbiens décrits jusqu'à présent. Pour revue, cf. par exemple HOFFMANN et al., dans [Phylogenetic Perspectives In Immunity: The Insect Host Defense. Chapitre 4, pp. 43-65 (1994)]:

1. Un premier groupe comprend des peptides linéaires constitués
15 essentiellement d'acides aminés basiques et hydrophobes ; dans ce groupe on classe en particulier les cécropines d'insectes et de mammifères, et les magainines de la peau des batraciens ;

2. Un deuxième groupe comprend des peptides comprenant des
20 ponts disulfure intramoléculaires ; dans ce groupe, on range en particulier les défensines d'insectes ou de mammifères, les brévinines de la peau de batraciens, la thanatine d'insecte, qui présente une homologie importante de séquence avec les brévinines [FEHLBAUM et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, pp. 1221-1225,(1996)], les tachyplésines, produites par des arthropodes marins primitifs, ainsi que différents peptides obtenus à partir de l'hémolymphe de scorpion [EHRET-SABATIER et al., J. Biol. Chem., 271, 47, pp. 29537-29544, (1996)] ;

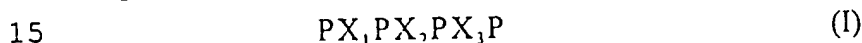
3. Le troisième groupe comprend des peptides riches en proline, parmi lesquels on peut classer les apidaécines et les abaécines des hyménoptères, la drosocine et la pyrrhocoricine, également produites par des insectes, et les bacténécines de mammifères. A cette classe appartient également le seul peptide anti-
30 microbien produit par un crustacé décapode qui avait été caractérisé jusqu'à présent : il s'agit d'un peptide antibactérien riche en proline, similaire à la bacténécine-7, et obtenu à partir des hémocytes du crabe *Carcinus maenas* [SCHNAPP et al.. Eur.J.Biochem. 240, pp. 532-539 (1996)].

4. La quatrième classe comprend des peptides ou polypeptides riches
35 en glycine, tels que les attacines, les sarcotoxines et les diptéricines, tous isolés chez les insectes.

Les Inventeurs ont maintenant purifié et caractérisé de nouveaux peptides anti-microbiens à partir de l'hémolymphe de crevettes pénéides, et ont également obtenu des séquences d'ADN codant pour ces peptides.

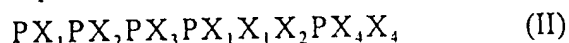
- La présente invention a pour objet ces peptides anti-microbiens, dénommés ci-après penaeidines, qui possèdent les caractéristiques suivantes :
- leur masse moléculaire est d'environ 5 à 7 kDa ;
 - leur pHi est supérieur ou égal à 9 ;
 - leur séquence N-terminale comprend une région (A) d'environ 15 à 25 acides aminés, riche en proline, (au moins 1/8, et de préférence entre 1/8 et 1/3 des acides aminés de cette région sont des prolines) ;
 - leur portion C-terminale comprend une région (B) d'environ 20 à 30 acides aminés, qui contient 6 résidus cystéine formant trois ponts disulfure intramoléculaires.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, la région (A) comprend la séquence (I) suivante :



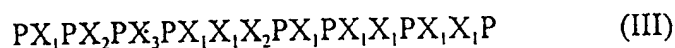
dans laquelle P représente une proline, X_1 représente un acide aminé neutre non-polaire, X_2 représente un acide aminé basique, X_3 représente une proline ou une liaison peptidique.

- Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, la région (A) comprend la séquence (II) suivante :



dans laquelle P, X_1 , X_2 et X_3 sont tels que définis ci-dessus, et X_4 représente un acide aminé neutre non-polaire ou une proline.

- Avantageusement, la région (A) comprend la séquence (III) suivante :



dans laquelle P, X_1 , X_2 et X_3 sont tels que définis ci-dessus.

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, les 6 résidus cystéine de la région (B) sont disposés selon la séquence (IV) suivante :



dans laquelle C représente une cystéine, S_1 représente un acide aminé ou une séquence peptidique de 2 ou 3 acides aminés, S_2 représente une séquence peptidique de 10 acides aminés, S_3 représente une séquence peptidique de 5 acides aminés.

- La présente Invention englobe également des peptides comprenant ou constitués par des fragments d'au moins 5 acides aminés d'une penaeidine telle que

définie ci-dessus, et en particulier des peptides comprenant ou constitués par la région (A) et/ou la région (B), ainsi que des peptides comprenant ou constitués par les séquences (I), (II), (III) et/ou (IV).

5 Selon un mode de réalisation préféré d'un peptide conforme à l'invention, son extrémité N-terminale est bloquée par un résidu d'acide pyroglutamique, et/ou son extrémité C-terminale est amidée.

A titre d'illustration de l'objet de la présente invention, les caractéristiques de 3 penaeidines isolées à partir de l'hémolymphe de la crevette *Penaeus vannamei*, dénommées ci-après penaeidine 1, penaeidine 2, et penaeidine 3,
10 sont plus spécifiquement indiquées ci-dessous.

Les séquences de ces 3 peptides (code 1 lettre) sont représentées sur les figures 1a (penaeidine 1), 1b (penaeidine 2), et 1c (penaeidine 3) ; l'alignement des 3 séquences est représenté sur la figure 1d : les séquences conservées sont encadrées. La figure 2 représente une séquence d'ADNc de la penaeidine 2 et la séquence
15 peptidique (code 3 lettres) correspondante ; la figure 3A représente une séquence d'ADNc de la penaeidine 3 et la séquence peptidique (code 3 lettres) correspondante ; la figure 3B représente les séquences peptidiques (code 1 lettre) d'autres isoformes de la penaeidine 3 : les variations de séquence sont encadrées.

Les séquences d'ADNc de la penaeidine 2 et de la penaeidine 3 sont
20 respectivement représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 1 et SEQ ID NO: 3, et les séquences de leurs produits de traduction sont respectivement représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 2 et SEQ ID NO: 4.

Les séquences peptidiques des formes matures des penaeidines 1, 2,
25 et 3 sont respectivement représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 et SEQ ID NO: 7.

Ces penaeidines ne présentent aucune homologie significative avec les peptides anti-microbiens connus dans l'art antérieur, et définissent un nouveau groupe de peptides anti-microbiens.

30 Les penaeidines 1 et 2 comprennent 50 acides aminés, et ont une masse moléculaire d'environ 5,5 kDa ; la penaeidine 3 comprend 62 acides aminés et sa masse moléculaire est d'environ 6,6 kDa.

Ce sont des peptides cationiques, possédant une charge nette positive de 7 pour les penaeidines 1 et 2, et de 8 pour la penaeidine 3 ; leurs points
35 isoélectriques calculés varient de 9,34 pour les penaeidines 1 et 2, à 9,84 pour la penaeidine 3.

Les 3 peptides ont un domaine N-terminal riche en proline, et un domaine C-terminal comprenant 6 résidus cystéine formant trois ponts disulfure intramoléculaires, et où les 4 résidus cystéine les plus proches de l'extrémité C-terminale sont organisés en 2 doublets séparés par 5 résidus.

5 Les cystéines les plus centrales sont respectivement séparées par un, deux ou trois résidus dans les penaeidines 1, 2, et 3.

L'extrémité N-terminale de la penaeidine 3 est bloquée par un résidu d'acide pyroglutamique. Le blocage par des résidus similaires a déjà été observé chez d'autres peptides anti-microbiens.

10 L'extrémité C-terminale des penaeidines 2 et 3 est amidée. Une telle amidation C-terminale a déjà été observée pour certains peptides anti-microbiens d'autres invertébrés marins (tachyplésines de Limule), ainsi que pour les cécropines d'insectes et les magainines d'amphibiens. Une telle modification renforce la stabilité de la molécule, et il semble qu'elle augmente l'activité anti-microbienne.

15 Les penaeidines possèdent une stabilité élevée, et sont en particulier très résistantes à la protéolyse. Elles sont essentiellement actives contre les bactéries à Gram positif, et présentent également une activité contre les bactéries à Gram négatif ; elles possèdent en outre des propriétés fongicides.

20 Les penaeidines et leurs fragments, tels que définis ci-dessus, peuvent être obtenus par exemple par extraction à partir des animaux qui les produisent, et également par synthèse peptidique, ou avantageusement, par génie génétique, en exprimant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour une penaeidine ou un fragment de celle-ci, dans une cellule hôte appropriée.

25 La présente Invention englobe également des acides nucléiques comprenant un segment d'au moins 10 pb, et de préférence au moins 18 pb du gène d'une penaeidine.

30 Des acides nucléiques conformes à l'invention, et en particulier des ADNc de penaeidine, ou des portions de ceux-ci peuvent être obtenus par criblage de banques d'acide nucléique à l'aide d'oligonucléotides dérivés des séquences représentées sur les figures 1, 2, ou 3, ou de leurs séquences complémentaires.

Des acides nucléiques conformes à l'invention englobent également des cassettes d'expression, comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour une penaeidine ou un fragment de celle-ci, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

35 Par « promoteur approprié » on entend tout promoteur fonctionnel dans la cellule-hôte destinée à héberger la cassette d'expression.

Une cassette d'expression conforme à l'invention peut également comprendre en outre une ou plusieurs séquence(s) d'acide nucléique permettant d'améliorer la sécrétion de la penaeidine ou de son fragment par la cellule-hôte, par exemple une séquence codant pour un peptide signal. La séquence d'acide nucléique
5 codant pour le peptide signal est placée à l'extrémité 5' de la séquence d'acide nucléique codant pour la penaeidine ou son fragment.

La séquence d'acide nucléique codant pour le peptide signal peut être une séquence codant pour un peptide signal de penaeidine, ou bien une séquence codant pour un peptide signal hétérologue. On choisira une séquence qui comprend à
10 l'extrémité C-terminale un site de protéolyse capable d'être reconnu par une signal-peptidase de la cellule hôte destinée à héberger la cassette d'expression.

L'invention a également pour objet :

- des vecteurs recombinants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un acide nucléique conforme à l'invention, et en particulier des vecteurs
15 comprenant une cassette d'expression telle que définie ci-dessus.

- des cellules procaryotes ou eucaryotes transformées par une cassette d'expression selon l'invention. Il peut s'agir de cellules maintenues en culture, ou de cellules faisant partie d'un organisme pluricellulaire, animal ou plante. La cassette d'expression présente dans la cellule transformée peut être soit incorporée
20 dans l'ADN chromosomique de ladite cellule, soit être portée par un vecteur extra-chromosomique.

L'invention a également pour objet un procédé de production d'une penaeidine ou d'un fragment de celle-ci, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression de ladite penaeidine ou dudit fragment, dans au moins une cellule transformée
25 conforme à l'invention.

Les peptides conformes à l'invention peuvent être exprimés dans des cultures de cellules transformées en utilisant des techniques similaires à celles utilisées pour des peptides antimicrobiens de l'art antérieur, par exemple dans des cellules d'insecte, comme décrit par HELLERS et al. [Eur. J. Biochem. 199, pp. 435-439,
30 (1991)] pour les cécropines, ou dans la levure, comme décrit par REICHHART et al. [Invertebrate Reproduction and Development, 21, pp. 15-24, (1992)].

Ils peuvent également être exprimés dans des animaux ou des plantes transgéniques, pour augmenter la résistance de ceux-ci aux infections, comme décrit par exemple par JAYNES et al., [Plant Science, 89, pp. 43-53 (1993)] dans le
35 cas de peptides analogues de la cécropine B, exprimés dans des plants de tabac

transgénique, ou par NORELLI et al. [Euphytica, 77, pp. 123-128 (1994)] pour des plants de pommiers transgéniques exprimant le gène de l'attacine-E.

Les peptides conformes à l'invention sont utilisables en particulier pour l'obtention de produits et en particulier de médicaments anti-infectieux, par exemple anti-bactériens ou fongicides.

De tels produits trouvent leur application pour la prévention et le traitement de différentes maladies microbiennes, dans des secteurs très variés, en particulier dans les domaines de la santé et de l'agriculture, et dans celui de l'aquaculture, pour limiter le développement de maladies infectieuses dans les élevages.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de purification des peptides anti-microbiens conformes à l'invention, et de leur caractérisation.

EXEMPLE 1 : ISOLATION DE PEPTIDES ANTI-MICROBIENS A PARTIR DE LA CREVETTE *PENAEUS VANNAMEI*.

225 ml d'hémolymph ont été obtenus à partir de 500 crevettes, par prélèvement à partir du sinus central, situé à la base du premier segment abdominal. Le prélèvement a été effectué en présence de tampon anticoagulant (10% citrate de sodium pH 7, additionné de 200 μ M de phénylthiourée et 40 μ g/ml d'aprotinine. L'hémolymph a alors été centrifugée à 700g pendant 15 minutes à 4°C pour éliminer les cellules sanguines. Le plasma et les hémocytes sont conservés séparément à -70°C jusqu'à utilisation.

1.1 Préparation des fractions de l'hémolymph par extraction acide

a) Plasma :

Le plasma est dilué avec de l'eau déminéralisée (1 volume de plasma pour 1 volume d'eau), et à ce mélange sont ajoutés 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique. Le pH a été amené à 3,9 à l'aide HCl 1M dans un bain refroidi à la glace, sous agitation douce pendant 1 heure. Deux centrifugations successives à 8000g et à 4°C ont été effectuées afin de clarifier le surnageant qui est conservé sur la glace à 4°C jusqu'à utilisation.

b) Hémocytes :

Cytosol

Après décongélation, les hémocytes sont homogénéisés à l'aide d'un appareil DOUNCE (maximum 152 μ , minimum 76 μ) dans du tampon Tris 50 mM

pH 8,7 contenant 50 mM de NaCl. Après centrifugation (8000g 20 mn 4°C), le surnageant (fraction cytosol) est acidifié à un pH de 3,6 par addition de 1M HCl et conservé à 4°C.

Organelles

- 5 Le culot contenant les organelles cellulaires est extrait par sonication (3 x 30 s) à puissance moyenne dans l'acide acétique 2 M. Les débris sont éliminés par centrifugation (8000g, 20 mn, 4°C) et l'extrait acide conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

1.2 Purification des peptides.

- 10 **A)Extraction en phase solide :**

La fraction plasmatique et les extraits cytosol et organelles ont été déposés séparément sur des cartouches SEP-PAK C₁₈ VAC de 35 cm³ (10 g WATERS ASSOCIATES), équilibrées avec de l'eau acidifiée (0,05% d'acide trifluoroacétique).

- 15 Après lavage à l'eau acidifiée, 3 éluions sont effectuées en utilisant successivement des solutions à 5%, 40%, et 80% d'acétonitrile dans l'eau acidifiée. Les différentes fractions obtenues sont lyophilisées, et reconstituées avec de l'eau microfiltrée préalablement à la purification par HPLC en phase inverse.

B)Purification HPLC

- 20 ***1 : HPLC en phase inverse.***

- Les fractions éluées à 5% et 40% de la colonne SEP-PAK ont été soumises à une chromatographie en phase inverse sur une colonne AQUAPORE RP300 C₈ (4,6 x 220 mm, BROWNLEE™), équilibrée dans l'eau acidifiée (0,05% TFA). La séparation de la fraction 5% SEP-PAK est effectuée à l'aide d'un
25 gradient linéaire de 0 à 5% d'acétonitrile dans l'eau acidifiée, à un débit de 1 ml/mn pendant 80 mn.

Pour la fraction 40%, un gradient linéaire de 2 à 60% d'acétonitrile est utilisé dans les mêmes conditions. Les fractions sont collectées, séchées sous vide, reconstituées à l'aide d'eau ultrafiltrée, et leur activité anti-microbienne est testée.

- 30 ***2 : Chromatographie d'exclusion.***

Les fractions obtenues à l'issue de la chromatographie en phase inverse présentant une activité anti-microbienne sont purifiées par chromatographie d'exclusion, en utilisant 2 colonnes HPLC reliées en série (colonne ULTRASPHEROGEL SEC 3000 et colonne ULTRASPHEROGEL SEC 2000,

7,5 × 300 mm, BECKMAN) protégées par une précolonne (ULTRASPHEROGEL SEC, 7,5 × 40 mm, BECKMAN).

L'élution est effectuée en condition isocratiques en présence de 30% d'acétonitrile dans l'eau acidifiée, à un débit de 0,5 ml/mn. Les fractions sont collectées et testées pour leur activité anti-microbiennes.

3 : *Chromatographie en phase inverse.*

Les peptides ont été purifiés par une chromatographie en phase inverse sur la même colonne que dans l'étape 1 à une température contrôlée de 35°C.

Les peptides 1 et 2 ont été purifiés avec un gradient biphasique linéaire : de 2 à 21% d'acétonitrile dans l'eau acidifiée (0,05% TFA) pendant 10 mn, puis de 21 à 35% d'acétonitrile pendant 50 mn à un débit de 0,25 ml/mn.

Le peptide 3 a été purifié à l'aide d'un gradient biphasique linéaire : de 2 à 23 % d'acétonitrile dans l'eau acidifiée pendant 10 mn, puis de 23 à 37% d'acétonitrile pendant 50 mn à un débit de 0,25 ml/mn à 35°C.

4 : *Dernières étapes de purification.*

Les dernières étapes de purification des peptides ont été effectuées sur colonne phase-inverse DELTA PAK HPI C₁₈, 2 x 150 mm, WATERS ASSOCIATES, à une température de 40°C avec un débit de 0,25 ml/mn en utilisant les gradients biphasiques décrits ci-dessus.

L'élution est contrôlée par absorption dans l'ultra-violet à 225 nm. Les fractions sont collectées dans des tubes en polypropylène, concentrées sous vide et reconstituées avec de l'eau stérilisée par filtration préalablement à la mesure de l'activité anti-microbienne.

EXEMPLE 2 : ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES FRACTIONS OBTENUES

Les fractions 40% SEP PAK obtenues à partir de l'extrait plasmatique, à partir des organelles des hémocytes, et à partir de la fraction cytosolique, qui sont respectivement désignées ci-après sous les dénominations P40, HO40 et HC40, ont été principalement étudiées. Toutes les fractions ont été testées pour leur activité contre 2 souches bactériennes et contre un champignon filamenteux.

Micro-organismes :

Les souches microbiennes utilisées pour déterminer les activités anti-microbiennes sont les suivantes :

- *Micrococcus luteus* (souche à Gram positif) ;

- *Escherichia coli* (souche à Gram négatif) ;
- *Neurospora crassa* (champignon filamenteux) ;

Les bactéries sont cultivées avec une densité optique de départ $A_{600} = 0,001$ en milieu nutritif « Poor-Broth » (1% bactotryptone, 0,5% NaCl p/v).

5 Essais antibactériens :

Les fractions ont été testées par inhibition de la croissance en phase liquide.

Des aliquotes de 10 μ l de chaque fraction à tester sont incubés dans des plaques de micro-titration avec 100 μ l d'une suspension de bactéries en milieu de phase logarithmique.

La croissance bactérienne est mesurée en déterminant la densité optique A_{600} après une incubation de 24 heures à 30°C.

Une procédure identique a été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des molécules sur ces souches bactériennes.

15 Les valeurs de la CMI correspondent à un intervalle a-b de concentrations en peptide, où a représente la concentration la plus élevée à laquelle on observe une croissance bactérienne, et b est la concentration la plus faible qui cause 100% d'inhibition de croissance.

Mesure des propriétés bactériostatiques :

20 Une culture de *Micrococcus luteus* en milieu de phase logarithmique, dans le milieu « Poor-Broth » défini ci-dessus, a été incubée à 30°C en présence du peptide ou (à titre de témoin) d'eau. La concentration finale des molécules testées est 8 fois supérieure à la CMI. Des aliquotes de 20 μ l sont prélevées à divers intervalles de temps et mises en culture sur plaque d'agar nutritif. Le nombre de colonies formées (UFC) est déterminé après 24 heures d'incubation à 37°C.

Activité antifongique :

L'activité antifongique a été déterminée contre *Neurospora crassa* et *Fusarium oxysporum* par un test d'inhibition de croissance en phase liquide.

30 80 μ l de spores de champignons (concentration finale : 10^4 spores/ml) sont suspendus dans du 1/2 Potato Dextrose Broth (DIFCO) supplémenté avec de la tétracycline (10 μ g/ml) et de la céfotaxime (100 μ g/ml). Cette suspension a été additionnée à 10 μ l de la fraction à tester dans des plaques de microtitration. Le volume final est amené à 100 μ l par addition de 10 μ l d'eau. L'inhibition de la croissance peut être observée au microscope après 24 heures d'incubation à 25°C dans

l'obscurité, et mesurée par la variation de densité optique à 600 nm au bout de 48 heures.

Aucune activité n'a été obtenue pour les fractions obtenues à partir de HC40. En revanche, comme le montrent respectivement les figures 4 et 5, certaines des fractions obtenues à partir de P40 et de HO40 présentent une activité anti-microbienne, et possèdent une zone active commune, correspondant aux fractions élues entre 47 et 60 mn (26 à 29% d'acétonitrile), où l'on observe une activité contre les 2 souches bactériennes et le champignon.

Légende des figures 4 et 5 :

Le temps d'élution en mn est indiqué en abscisse. L'absorbance à 225 nm est représentée en ordonnée. L'activité anti-microbienne contre *Escherichia coli* D31 (rectangle hachuré), *Micrococcus luteus* (rectangle noir) et *N.crassa* (rectangle gris) est indiquée pour les fractions concernées. Les régions de la courbe correspondant aux fractions présentant une activité anti-microbienne sont indiquées par les lettres A, B et C. Les fractions à partir desquelles ont été purifiés les penaeidines 1, 2 et 3 sont indiquées par les flèches 1, 2 et 3.

2 régions présentant également une activité anti-microbienne ont été obtenues après chromatographie en phase inverse de la fraction plasmatique. Les fractions P40B, qui sont élues vers 40 mn (21-22% d'acétonitrile), contiennent des molécules actives contre les 3 micro-organismes testés, et P40C, correspondant à des molécules élues à environ 75 mn, 38-39% d'acétonitrile, sont actives uniquement contre *Micrococcus luteus*. Aucune de ces deux zones n'est présente dans le chromatogramme de HO40, dans lequel d'autres fractions élues à environ 90 mn (45-46% d'acétonitrile) sont actives seulement contre *Micrococcus luteus*.

EXEMPLE 3 : DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES PEPTIDES OBTENUS.

Les trois peptides purifiés comme indiqué à l'exemple 1 ci-dessus ont été caractérisés par des techniques successives de biochimie et de biologie moléculaire.

Leur masse moléculaire a été déterminée par spectrométrie de masse ; cette masse moléculaire est respectivement de 5484,8 Da et 5520,0 Da pour les peptides P1 et P2, et de 6617,4 Da pour le peptide P3.

* La séquence d'acides aminés de P1 a pu être obtenue par séquençage direct par dégradation d'Edman.

P1 est un peptide de 50 résidus, contenant 14% de proline parmi les 19 résidus N-terminaux, et 6 cystéines formant 3 ponts disulfure intramoléculaires dans le domaine C-terminal. P1 est riche en acides aminés basiques, comme l'indique la présence de 5 arginines et 2 lysines distribuées sur toute la longueur du peptide.

5 * En ce qui concerne le peptide P2, le séquençage direct n'a permis d'obtenir qu'une séquence partielle de 21 résidus N-terminaux. Cette séquence ne diffère de celle de la penaeidine 1 que par le remplacement de la leucine en position 20 chez P1 par une phénylalanine chez P2.

10 * En ce qui concerne le peptide P3, sa séquence N-terminale n'a pas pu être établie par la technique de dégradation d'Edman, ce qui suggère un blocage à son extrémité N-terminale.

La S-pyridyléthylation suivie par l'analyse en spectrométrie de masse, et la détection de la variation de masse induite par la S-pyridyléthylation, montre la présence de 6 résidus cystéines. Après clivage enzymatique du peptide
15 S-pyridyléthylé, les fragments obtenus ont été purifiés, analysés par spectrométrie de masse, et par dégradation d'Edman. La séquence de l'extrémité NH₂-terminale a été déterminée par nanoES-MS (nano Electrospray Mass Spectrometry). Il a ainsi pu être déterminé que le résidu NH₂-terminal de ce peptide était cyclisé en acide pyroglutamique.

20 **EXEMPLE 4 : CLONAGE DES ADN_C DES PENAIDINES.**

- ADN_C de la penaeidine 3 :

Une sonde constituée d'oligonucléotides dégénérés correspondant aux résidus 38-44 du peptide P3, et présentant la séquence suivante :

5'(GGIAT(A/T/C)(A/T)(G/C)ITT(C/T)(A/T)(G/C)ICA(A/G)GC)3'

25 a été préparée.

Cette sonde a permis d'obtenir par transcription inverse suivie d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) à partir des ARN poly(A)⁺ totaux d'hémocytes de crevettes adultes, récoltés 6 et 12 heures après un challenge bactérien, un produit d'amplification constitué par un fragment de 497 paires de bases. Après
30 séquençage, ce fragment a été identifié comme un fragment de l'ADN_C de P3, constitué par l'extrémité du cadre de lecture ouvert et la région 3' non traduite. Un sous-fragment de 440 paires de bases, obtenu par digestion enzymatique BsaI à partir de ce fragment de 497 paires de bases, et constitué principalement de la région 3' non-traduite, a été cloné dans un vecteur pBluescript (STRATAGENE, La Jolla, CA). Ce
35 fragment a été marqué par amorçage aléatoire en utilisant le kit de marquage d'ADN

READY-TO-GO (PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Sweden), et utilisé pour cribler une banque d'ADNc obtenus à partir des ARN poly(A)[±] de crevettes adultes, dans le vecteur ZAP-EXPRESS (STRATAGENE, La Jolla, CA).

Des hybridations à stringence élevée ont été effectuées pendant une nuit à 65°C dans une solution de Denhardt 5X, 5X SSPE, 0,1% SDS, en présence de 100 µg/µl d'ADN de sperme de saumon.

161 clones positifs ont été obtenus. Parmi ces clones, 4 ont été séquencés. L'un d'entre eux contenait un cadre de lecture ouverte codant pour une séquence de 81 acides aminés (P3a) débutant par un codon méthionine et se terminant par un codon stop.

La séquence en acides aminés déduite de ce cadre de lecture ouverte commence par un peptide signal de 19 résidus riche en résidus hydrophobes. Le site de clivage de la signal-peptidase a été localisé après le résidu glycine précédant la glutamine en position 1.

Ce peptide-signal est directement suivi, à son extrémité C-terminale, par un peptide de 63 acides aminés, débutant par un résidu glutamine. La séquence en acides aminés déduite de ce peptide mature confirme clairement les séquences partielles de la penaeidine 3 obtenues par séquençage direct.

En partant de l'hypothèse que la penaeidine 3 sous forme mature débute par un acide pyroglutamique résultant de la cyclisation du résidu glutamine (observée par approche biochimique), la masse calculée à partir de la séquence en acides aminés déduite est supérieure de 56,4 Da à la masse mesurée. Ceci suggère que la penaeidine 3 est amidée à son extrémité C-terminale par élimination d'un résidu glycine (57 Da).

Parmi les 3 autres clones séquencés, 2 séquences déduites en acides aminés légèrement différentes ont été identifiées (P3b et P3c). P3b diffère de P3a par le remplacement d'une isoleucine à la position 30 chez P3a par une valine chez P3b, alors que P3c est dépourvu, en position 33, d'une proline qui est présente chez P3a et P3b. Enfin, la leucine en position 40 chez P3a et P3b est remplacée par une valine chez P3c.

- ADNc de la penaeidine 2 :

Afin d'isoler les ADNc des autres penaeidines, une sonde correspondant à une portion de la séquence codante de la penaeidine 3 dont la séquence du produit de traduction est fortement conservée entre les 3 peptides purifiés, a été utilisée.

Cette sonde a été obtenue par amplification en chaîne par polymérase sur un clone d'ADNc de P3, en utilisant les amorces suivantes :

amorce amont : 5'GTGTACAAGGGCGGTTACACG3' (SEQ ID NO: 8).

amorce aval : 5'CAACAGGTTGTCAAGCGAGGT3' (SEQ ID NO: 9).

5 L'hybridation est effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus, mais à une température d'hybridation plus faible (50°C), afin d'assurer une stringence moins élevée.

Les clones obtenus dans ces conditions ont été analysés sur la base de leur profil de restriction. Pour l'un de ces clones, ce profil était différent de celui observé pour P3a. Ce clone a été séquencé. La séquence en acides aminés déduite de la séquence d'ADN possède un pourcentage d'identité très élevé avec la penaeidine 1, en particulier un domaine COOH-terminal totalement identique à celui établi par séquençage direct de la penaeidine 1. Cependant, la présence d'un résidu phénylalanine en position 20 dans le peptide mature, ainsi que la valeur de la masse moléculaire, est en faveur de l'ADNc de la penaeidine 2. La séquence en acides aminés déduite comporte un acide aminé supplémentaire (glycine à l'extrémité C-terminale, par rapport à celle obtenue par séquençage direct, ce qui suggère que ce résidu glycine peut être éliminé par amidation. Ceci a été confirmé par le calcul de la masse (5575,6 Da) qui est supérieure de 55,6 Da à la masse mesurée pour la penaeidine 2, alors que la masse calculée du peptide amidé correspond à celle de la penaeidine 2 mesurée par spectrométrie de masse.

Il apparaît en outre que la penaeidine 2 provient d'une molécule précurseur possédant une région « pré » de 21 résidus, identique à celle du peptide-signal de la penaeidine 3, avec deux résidus supplémentaires (Glu-Ala) précédant immédiatement le site de clivage observé. Un autre site de clivage potentiel a été localisé à la position -3 en amont du résidu Tyr-1. Cet autre site correspond à celui qui est observé dans la maturation de la penaeidine 3.

EXEMPLE 5 : ACTIVITE ANTI-MICROBIENNE DE LA PENAIDINE 3 PURIFIEE.

30 L'activité de la penaeidine 3 purifiée a été testée comme décrit à l'exemple 2, contre *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* D31, *Neurospora crassa*, et également contre *Fusarium oxysporum* qui est un champignon pathogène des crevettes pénéides.

Ce peptide a une activité marquée contre *Micrococcus luteus* (CMI = 0,6 à 2,5 µM) et une activité modérée sur *Escherichia coli* (CMI>5 µM). La penaeidine 3 est également active contre les 2 champignons testés (CMI>5 µM).

Lorsque l'on procède à l'incubation de la penaeidine 3 avec *Micrococcus luteus* à une concentration de 18 μ M, c'est-à-dire 8 fois supérieure à la CMI, aucune croissance bactérienne n'est observée après une incubation de 24 heures. De plus, le nombre de colonies formées reste constant au cours des différents
5 prélèvements, ce qui suggère que cette molécule a un effet bactériostatique. Ces résultats sont illustrés par le tableau 2 ci-dessous.

TABLEAU II

Temps d'incubation	Contrôle	Penaeidine 3
<i>10⁴ ufc/ml</i>		
1 min	3,85	4,30
30 min	4,40	4,45
2 h	6,70	3,15
4 h	9,45	4,60
7 h	51,50	4,50
24 h	>1 000	5,60

EXEMPLE 6 : PRODUCTION DE PENAEIDINES RECOMBINANTES

Des fragments d'ADN codant pour les pénaeidines-2 ou -3
10 flanquées à leur extrémité amino-terminale ont été obtenus par PCR en utilisant les
amorces suivantes, qui permettent d'insérer, en amont de la séquence codant pour la
pénaeidine, une séquence codant pour les cinq derniers résidus de la prorégion du
facteur sexuel MF α 1 de levure et un site HindIII, et en aval de la séquence codant
pour la pénaeidine, un site BamHI.

15 Amorces utilisées pour la pénaeidine-2 :

P2-SENS : 5' GCGCGCAAGCTTGGACAAGAGATACAGGGGCGGTTAC 3',
Hind III

Hind III

P2-ANTI : 5' GCGCGCGGATCCTTATCCTTTTACTAAGTGACAAC 3',
Bam HI

Bam HI

20 Ces 2 amorces sont respectivement représentées dans la liste de séquences sous les
numéros SEQ ID NO: 10 et SEQ ID NO: 11

Amorces utilisées pour la pénaeidine-3 :

P3-SENS : 5' GCGCGCAAGCTTGGACAAGAGACAAGTGTACAAGGGC 3',
Hind III

Hind III

25 P3-ANTI : 5' GCGCGCGGATCCTCAAACCGGAATATCC 3'
Bam HI

Bam HI

Ces 2 amorces sont respectivement représentées dans la liste de séquences sous les numéros SEQ ID NO: 12 et SEQ ID NO: 13

L'enzyme utilisée pour la PCR est la Vent polymérase (NEW ENGLAND BIOLABS) qui génère des extrémités franches. Les fragments obtenus
5 ont été clonés entre les sites HindIII et BamHI du lieu multisite du plasmide pCR-SCRIPT (STRATAGENE).

Les inserts des plasmides ainsi obtenus ont été excisés par BamHI et HindIII, et sous-clonés dans la cassette d'expression de levure du vecteur pJV1. Le vecteur pJV1 a été fourni par le laboratoire du Professeur HOFFMANN à Strasbourg :
10 il s'agit d'un plasmide dérivé de pBLUESCRIPT II dans lequel ont été introduits le promoteur du facteur sexuel MF α 1 de levure et la préproséquence de ce même facteur, dans laquelle on a créé par mutation silencieuse un site de restriction HindIII permettant la fusion en phase des séquences codantes.

Les cassettes complètes (environ 1,4 kb) ont été excisées de pJV1
15 par double digestion SphI-BamHI (digestion SphI partielle pour la pénaeidine-2) et sous-clonées dans le vecteur navette pTG4812 [MICHAUD et al. FEBS Lett. 395: 6-10 (1996)].

Les deux vecteurs d'expression ainsi obtenus sont dénommés pen2-pTG4812 et pen3-pTG4812, et permettent respectivement l'expression de la
20 pénaeidine 2 et celle de la pénaeidine 3 chez la levure.

Pour la production des pénaeidines recombinantes, on a utilisé la souche de *Saccharomyces cerevisiae* TGY48-1, décrite par REICHHART et al. [Invert. Reprod. Dev. 21(1): 15-24 (1992)]. Elle porte une mutation *ura3- Δ 5* qui permet la sélection de clones recombinants sur milieu sélectif dépourvu d'uracile.
25

Cette souche a été transformée avec les plasmides recombinants pen2-pTG4812 et pen3-pTG4812 selon la méthode à l'acétate de lithium décrite par GIETZ et al. [Nucl. Ac. Res. 20(6): 1425 (1992)]. Les clones de levure recombinants ont été sélectionnés sur milieu sélectif « YNBG-casaminoacids » dépourvu d'uracile, et mis en culture. Les pénaeidines recombinantes sont sécrétées dans le milieu de culture, et
30 sont purifiées à partir du surnageant de culture selon un protocole similaire à celui décrit dans l'exemple 1 ci-dessus.

REVENDICATIONS

1) Peptide anti-microbien, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu à partir de crevettes péneïdes, et en ce que

- sa masse moléculaire est d'environ 5 à 7 kDa ;

5 - son pHi est supérieur ou égal à 9 ;

- sa portion N-terminale comprend une région (A) d'environ 15 à 25 acides aminés, qui comprend la séquence (I) suivante :

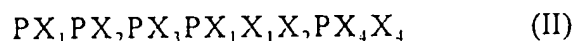


dans laquelle P représente une proline, X_1 représente un acide aminé neutre non-polaire, X_2 représente un acide aminé basique, X_3 représente une proline ou une liaison peptidique ;

- sa portion C-terminale comprend une région (B) d'environ 20 à 30 acides aminés, qui contient 6 résidus cystéine formant trois ponts disulfure intramoléculaires.

2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que la région

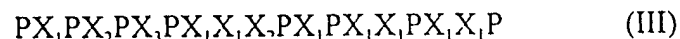
15 (A) comprend la séquence (II) suivante :



dans laquelle P, X_1 , X_2 et X_3 sont tels que définis ci-dessus, et X_4 représente un acide aminé neutre non-polaire ou une proline.

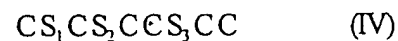
3) Peptide selon la revendication 2, caractérisé en ce que la région

20 (A) comprend la séquence (III) suivante :



dans laquelle P, X_1 , X_2 et X_3 sont tels que définis ci-dessus.

4) Peptide selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les 6 résidus cystéine de la région (B) sont disposés selon la séquence (IV) suivante :



dans laquelle C représente une cystéine, S_1 représente un acide aminé ou une séquence peptidique de 2 ou 3 acides aminés, S_2 représente une séquence peptidique de 10 acides aminés, S_3 représente une séquence peptidique de 5 acides aminés.

5) Peptide selon une quelconque des revendications 1, 2, ou 4, choisi dans le groupe constitué par :

le peptide de séquence SEQ ID NO: 5

le peptide de séquence SEQ ID NO: 6

35 le peptide de séquence SEQ ID NO: 7.

6) Peptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'au moins 5 acides aminés d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

5 7) Peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que son extrémité N-terminale est bloquée par un résidu d'acide pyroglutamique, et/ou son extrémité C-terminale est amidifiée.

8) Acide nucléique comprenant un segment d'au moins 10 pb, et de préférence au moins 20 pb d'une séquence codant pour un peptide selon une quelconque des revendications 1 à 7.

10 9) Cassette d'expression, comprenant au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 8, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

10) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins un acide nucléique selon la revendication 8.

15 11) Cellule procaryote ou eucaryote transformée par une cassette d'expression selon la revendication 9.

20 12) Procédé de production d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression d'un acide nucléique selon la revendication 8, dans au moins une cellule transformée selon la revendication 11.

13) Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour l'obtention d'un médicament.

1/5

- a) YRGYTGPIPRPPPIGRPPPLRLVVCACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK
- b) YRGYTGPIPRPPPIGRPPFRPVCNACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK*
- c) pEVYKGGYTRPIPRPPPFVRPLPGGPIGPYNGCPVSCRGISFSQARSCCSRLGRCCCHVGKGYS*
- d) YRGYTGPIPRPPPIGRPPPLR-----LVVQ--ACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK
 YRGYTGPIPRPPPIGRPPFR-----PVC-NACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK*
 pEVYKGGYTRPIPRPPPFVRPLPGGPIGPYNGCPVSCRGISFSQARSCCSRLGRCCCHVGKGYS*

FIGURE 1

```

1  AAT TCG GCA CGA GGT CCC TCT AGC CTC ACC TGC AGA GAC CGA CGC TCC GAG CCC GGG TTC CCT OCT GCG TCC GCC ATG CCG CTC GTG GTC 14
    Met Arg Leu Val Val
91  Cys Leu Val Phe Leu Ala Ser Phe Ala Leu Val Cys Gln Gly Glu Ala Tyr Arg Gly Gly Tyr Thr Gly Pro Ile Pro Arg Pro Pro Pro 44
    TGC CTG GTC TTC TTG GGC TCC TTC GGC CTC GGC TGC CAA GGC GAA GCG TAC AGG GGC GGT TAC ACA GGC CCG ATA CCC AGG CCA CCA CCC
15  Ile Gly Arg Pro Phe Arg Pro Val Cys Asn Ala Cys Tyr Arg Leu Ser Val Ser Asp Ala Arg Asn Cys Cys Ile Lys Phe Gly Ser
181 ATT CGA AGA CCA CCG TTC AGA CCT GGT TGC AAT GCA TGC TAC AGA CTT TCC GTC TCA GAT GCT CCG AAT TGC TGC ATC AAG TTC CGA AGC
45  Cys Cys His Leu Val Lys Gly *
271 TGT TGT CAC TTA GTA AAA GGA TAA AGA AGA AAT TGA CCG AGA AGA CAA TGG AAA CCT GCG TTG ACA ACT TGT TAA TTA ATA CTC ATA TGT GAA
361 GAG ATT GCA ACC CTG ATT TGT GTC AAG GAT GTG GGT ATT TCG TCT ATC CAT CCG TAA AGA TTC CAT GAA TGT ATG ATG AAG GAA AGT
451 GCA TGT GTG TAA GTA TGT ATG TAT GTG CTT ACA GGT ATT TGT TGC ATT AAG TGT CCG TGT ATT TAG GAT CTG CAA CAC ACG ACG AAG AGA
541 ATA TTT GCC ACT TGC CAT TTA TTT CAG TTT CTG TAA GTG TGG ATC TGT TGT GAG AGG TTG GTG TIG ACA GAT CTC TCT TTT ACA AAT AAA TTT
631 GAT ATC TGT GAA AAA AAA AAA AAA A

```

FIGURE 2

A

[illegible]

3

p3-a
 p3-b
 p3-c

FIGURE 3

4/5

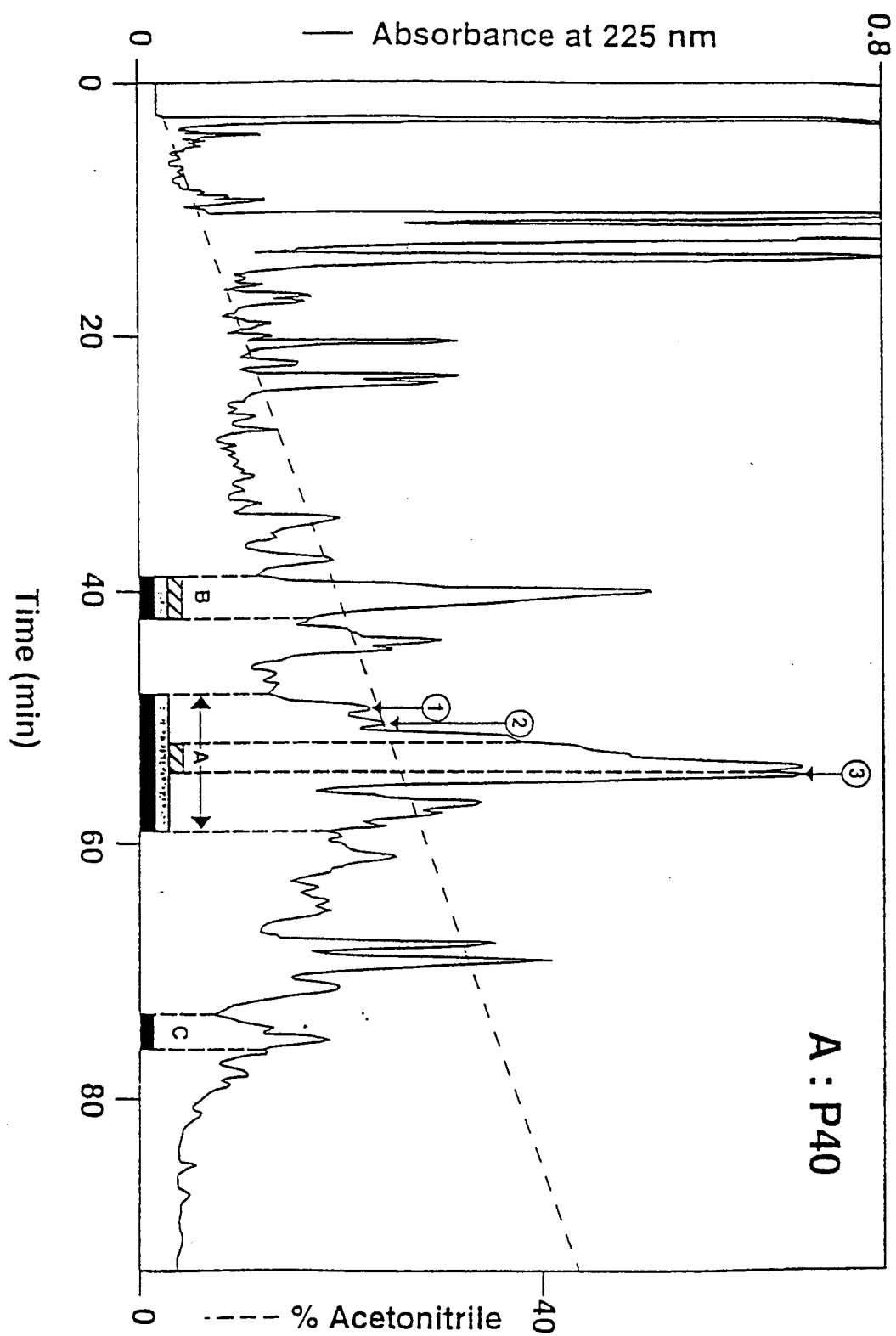


Figure 4

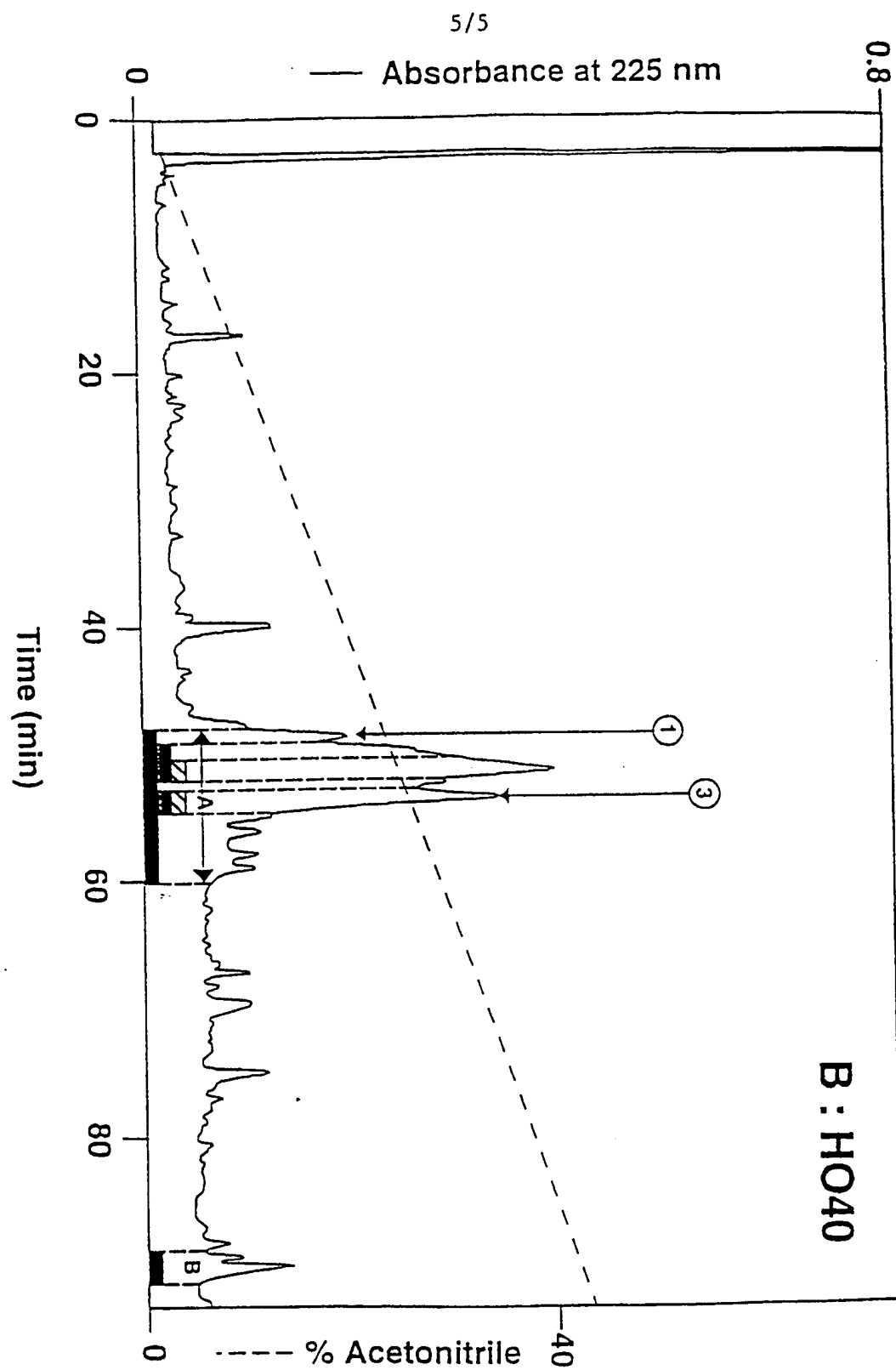


Figure 5

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> DESTOUMIEUX, Delphine
 BACHERE, Evelyne
 BULET, Philippe
 IFREMER
 CNRS

<120> PEPTIDES ANTI-MICROBIENS DE CRUSTACES

<130> MJPrm712/5

<140>

<141>

<150> FR9709214

<151> 1997-07-21

<160> 13

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 658

<212> ADN

<213> Penaeus vannamei

<220>

<221> CDS

<222> (76)..(294)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (139)..(294)

<400> 1

aattcggcac gagctccctc tagcctcacc tgcagagacc gacgctccga gcccggttc 60

cctcctgcgt ccgcc atg cgc ctc gtg gtc tgc ctg gtc ttc ttg gcc tcc 111
 Met Arg Leu Val Val Cys Leu Val Phe Leu Ala Ser
 -20 -15 -10

ttc gcc ctg gtc tgc caa ggc gaa gcg tac agg ggc ggt tac aca ggc 159
 Phe Ala Leu Val Cys Gln Gly Glu Ala Tyr Arg Gly Gly Tyr Thr Gly
 -5 -1 1 5

ccg ata ccc agg cca cca ccc att gga aga cca ccg ttc aga cct gtt 207
 Pro Ile Pro Arg Pro Pro Pro Ile Gly Arg Pro Pro Phe Arg Pro Val

10	15	20	
tgc aat gca tgc tac aga ctt tcc gtc tca gat gct cgc aat tgc tgc			255
Cys Asn Ala Cys Tyr Arg Leu Ser Val Ser Asp Ala Arg Asn Cys Cys			
25	30	35	
atc aag ttc gga agc tgt tgt cac tta gta aaa gga taa agaaattgac			304
Ile Lys Phe Gly Ser Cys Cys His Leu Val Lys Gly			
40	45	50	
ggagaagaca atggaaacct ggcttgacaa cttgttaatt aatactcata tgtgaagaga			364
ttgcaaccct gatttgtgtc aaggatgtgg gtatttcgtc tatccatcgc taaagattct			424
tccatgaatg tatgatgaag gaaagtgcac gtgtgtaagt atgtatgtat gtgcttacag			484
gtatttgttg cattaagtgt ccgtgtatctt aggatctgca acacacgagg aagagaatat			544
ttgccacttg ccatttatctt cagtttctgt aagtgtggat ctgtgagagg ttggtgttga			604
cagatctctc ttttacaaat aaatttgata tctgtgaaaa aaaaaaaaaa aaaa			658

<210> 2

<211> 72

<212> PRT

<213> *Penaeus vannamei*

<400> 2

Met Arg Leu Val Val Cys Leu Val Phe Leu Ala Ser Phe Ala Leu Val
1 5 10 15

Cys Gln Gly Glu Ala Tyr Arg Gly Gly Tyr Thr Gly Pro Ile Pro Arg
20 25 30

Pro Pro Pro Ile Gly Arg Pro Pro Phe Arg Pro Val Cys Asn Ala Cys
35 40 45

Tyr Arg Leu Ser Val Ser Asp Ala Arg Asn Cys Cys Ile Lys Phe Gly
50 55 60

Ser Cys Cys His Leu Val Lys Gly
65 70

<210> 3

<211> 736

<212> ADN

<213> *Penaeus vannamei*

<220>

<221> CDS

<222> (71)..(319)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (128)..(319)

<400> 3

aattcggcac gagtcgagcc tcacctgcag agaccgacgc tccgagcccg ggttccctcc 60

tgcgtccgcc atg cgc ctc gtg gtc tgc ctg gtc ttc ttg gcc tcc ttc 109

Met Arg Leu Val Val Cys Leu Val Phe Leu Ala Ser Phe

-15

-10

gcc ctg gtc tgc caa ggc caa gtg tac aag ggc ggt tac acg cgc ccg 157

Ala Leu Val Cys Gln Gly Gln Val Tyr Lys Gly Gly Tyr Thr Arg Pro

-5

-1

1

5

10

ata ccc agg cca cca ccc ttc gtg aga cct ttg cca gga ggg cct att 205

Ile Pro Arg Pro Pro Pro Phe Val Arg Pro Leu Pro Gly Gly Pro Ile

15

20

25

ggt cca tac aac ggt tgc cct gtc tca tgc cgg gga att tcc ttc tca 253

Gly Pro Tyr Asn Gly Cys Pro Val Ser Cys Arg Gly Ile Ser Phe Ser

30

35

40

caa gcg cgt tct tgc tgc tcc cgg tta ggg cgt tgc tgt cac gtg gga 301

Gln Ala Arg Ser Cys Cys Ser Arg Leu Gly Arg Cys Cys His Val Gly

45

50

55

aag gga tat tcc ggt tga tggagaacac gatgaaaacc tcgcttgaca 349

Lys Gly Tyr Ser Gly

60

acctgttgat tgatacttgt atgtgaagag actgtgatcc tgattttgca ctgtgttttc 409

tcgttcaata ttcttactct ggcttgtgga atggatgtag ttatttgacc ctatgttttt 469

ttttaagact ttccatgaa tgcacgatga atgaaagctt gcgtgatatg aatgagtgca 529

tccacttttc aacgtcccag caggtggcgc cgtattcatg atttgtgaca cacgaggaag 589

taaatccatg ccattctgctt ttcgttgtaa tttttagtga gtatggatct gtgtgtgggt 649

gattttttaca aatctctcaa aggactttta gaaatgttac tcctttacaa ataaaattgg 709

tatcttgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

736

<210> 4

<211> 82

<212> PRT

<213> *Penaeus vannamei*

<400> 4

Met Arg Leu Val Val Cys Leu Val Phe Leu Ala Ser Phe Ala Leu Val

1

5

10

15

Cys Gln Gly Gln Val Tyr Lys Gly Gly Tyr Thr Arg Pro Ile Pro Arg

20

25

30

Pro Pro Pro Phe Val Arg Pro Leu Pro Gly Gly Pro Ile Gly Pro Tyr

35

40

45

Asn Gly Cys Pro Val Ser Cys Arg Gly Ile Ser Phe Ser Gln Ala Arg

50

55

60

Ser Cys Cys Ser Arg Leu Gly Arg Cys Cys His Val Gly Lys Gly Tyr

65

70

75

80

Ser Gly

<210> 5

<211> 50

<212> PRT

<213> *Penaeus vannamei*

<400> 5

Tyr Arg Gly Gly Tyr Thr Gly Pro Ile Pro Arg Pro Pro Pro Ile Gly

1

5

10

15

Arg Pro Pro Leu Arg Leu Val Val Cys Ala Cys Tyr Arg Leu Ser Val

20

25

30

Ser Asp Ala Arg Asn Cys Cys Ile Lys Phe Gly Ser Cys Cys His Leu

35

40

45

Val Lys

50

<210> 6

<211> 50
<212> PRT
<213> *Penaeus vannamei*

<400> 6
Tyr Arg Gly Gly Tyr Thr Gly Pro Ile Pro Arg Pro Pro Pro Ile Gly
1 5 10 15
Arg Pro Pro Phe Arg Pro Val Cys Asn Ala Cys Tyr Arg Leu Ser Val
20 25 30
Ser Asp Ala Arg Asn Cys Cys Ile Lys Phe Gly Ser Cys Cys His Leu
35 40 45
Val Lys
50

<210> 7
<211> 62
<212> PRT
<213> *Penaeus vannamei*

<400> 7
Gln Val Tyr Lys Gly Gly Tyr Thr Arg Pro Ile Pro Arg Pro Pro Pro
1 5 10 15
Phe Val Arg Pro Leu Pro Gly Gly Pro Ile Gly Pro Tyr Asn Gly Cys
20 25 30
Pro Val Ser Cys Arg Gly Ile Ser Phe Ser Gln Ala Arg Ser Cys Cys
35 40 45
Ser Arg Leu Gly Arg Cys Cys His Val Gly Lys Gly Tyr Ser
50 55 60

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> *Penaeus vannamei*

<220>
<223> PCR primer

<220>
<223> PCR primer

<400> 8
gtgtacaagg gcggttacac g 21

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Penaeus vannamei

<220>
<223> PCR primer

<400> 9
caacagggttg tcaagcgagg t 21

<210> 10
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 10
gcgcgcaagc ttggacaaga gatacagggg cggttac 37

<210> 11
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 11

<210> 12
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 12

gcgcgcaagc ttggacaaga gacaagtgtgta caagggc

37

<210> 13

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

gcgcgcggat cctcaaaccg gaatatcc

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intellectual Application No

PCT/FR 98/01583

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/435 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>DESTOUMIEUX D ET AL: "Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp <i>Penaeus vannamei</i> (Decapoda)."</p> <p>J BIOL CHEM, NOV 7 1997, 272 (45) P28398-406, XP002060968 UNITED STATES see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 1999

Date of mailing of the international search report

15/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01583

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SCHNAPP D ET AL: "Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, Carcinus maenas"</p> <p>EUR. JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 3, 1996, pages 532-539, XP002060970</p> <p>cited in the application</p> <p>see page 535, right-hand column - page 536, left-hand column</p> <p>---</p>	1,2,6,8
Y	<p>EHRET-SABATIER L ET AL: "Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 271, 1996, pages 29537-29544, XP002060972</p> <p>MD US</p> <p>cited in the application</p> <p>see figures 5,6</p> <p>---</p>	1,2,6,8
X	<p>KUHN R ET AL: 'Male specific sperm protein MST84DC'</p> <p>Swissprot Database entry M84c_Drome</p> <p>Accession number Q01644, 01-Jul-1993</p> <p>XP002091985</p> <p>see sequence</p> <p>-----</p>	6,7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derrière Internationale No

PCT/FR 98/01583

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/12 C07K14/435 A61K38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>DESTOUMIEUX D ET AL: "Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp Penaeus vannamei (Decapoda)."</p> <p>J BIOL CHEM, NOV 7 1997, 272 (45)</p> <p>P28398-406, XP002060968</p> <p>UNITED STATES</p> <p>voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive que le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

document faisant partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>SCHNAPP D ET AL: "Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, <i>Carcinus maenas</i>"</p> <p>EUR. JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 3, 1996, pages 532-539, XP002060970</p> <p>cité dans la demande</p> <p>voir page 535, colonne de droite - page 536, colonne de gauche</p> <p>---</p>	1,2,6,8
Y	<p>EHRET-SABATIER L ET AL: "Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 271, 1996, pages 29537-29544, XP002060972</p> <p>MD US</p> <p>cité dans la demande</p> <p>voir figures 5,6</p> <p>---</p>	1,2,6,8
X	<p>KUHN R ET AL: 'Male specific sperm protein MST84DC'</p> <p>Swissprot Database entry M84c_Drome</p> <p>Accession number Q01644, 01-Jul-1993</p> <p>XP002091985</p> <p>see sequence</p> <p>-----</p>	6,7